

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表  
特表2002-50  
(P2002-5028)

(43) 公表日 平成14年1月29日

(51) Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	P I	7-71
A 6 1 K 35/12		A 6 1 K 35/12	4
A 6 1 B 17/56		A 6 1 B 17/56	4
A 6 1 F 2/28		A 6 1 F 2/28	4
A 6 1 K 9/00		A 6 1 K 9/00	4
38/22		A 6 1 L 27/00	J 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全108頁)			

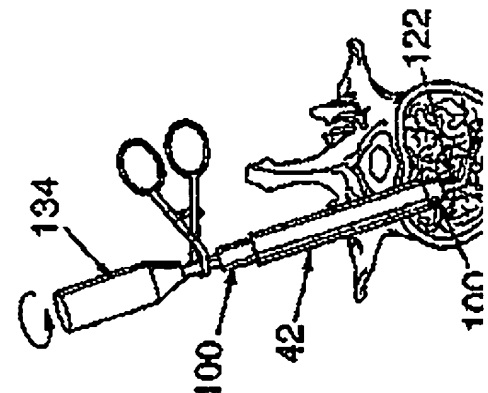
(21) 出願番号 特願2000-530221(P2000-530221)  
 (86) (22) 出願日 平成11年2月10日(1999.2.10)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年8月10日(2000.8.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US99/02946  
 (87) 国際公開番号 WO99/39724  
 (87) 国際公開日 平成11年8月12日(1999.8.12)  
 (31) 優先権主張番号 60/074, 240  
 (32) 優先日 平成10年2月10日(1998.2.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/074, 451  
 (32) 優先日 平成10年2月12日(1998.2.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 オレゴン ヘルス サイエンス  
 パーシティー  
 アメリカ合衆国 オレゴン州  
 ドエル335 エス. ダブリュ.  
 ジャクソン パーク ロード  
 フィス オブ テクノロジー  
 ト  
 (72) 発明者 ホーリンガー ジェフリー  
 アメリカ合衆国 オレゴン州  
 ドエル335 エス. ダブリュ. ソ  
 ト 9707  
 (74) 代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

(54) 【発明の名称】 骨芽細胞の前駆細胞による骨欠損の治療

## (57) 【要約】

多孔質基質中に骨芽細胞前駆細胞 (OPC) を保持させ、それを骨欠損部に移植することにより、骨欠損の治療が促進される。OPCには、BMP-2などの付着誘導因子 (BMP) を発現するように形質転換を施すことができる。骨欠損部にOPCを導入するための装置も開示される。装置の1つは、一方の通路を通して内視鏡 (122) を導入することができ、細胞が障害される程度にOPCに対する圧力を高めることなく、内視鏡または別の通路を辿ってOPCが導入されるような、同軸通路 (122) を有するカニューレ



(2)

特表2002-

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 多孔質基質、および骨形成性細胞系（osteogenic line）への分化を運命づけられた治療的有効量の細胞を含む、骨欠損を治療する組成物。

**【請求項2】** 骨形成性細胞系への分化を運命づけられた細胞が、骨芽前駆細胞系1（OPC1）を特定する特徴を有する条件的不死化骨芽細胞前駆細胞である、請求項1記載の組成物。

**【請求項3】** 骨形成性前駆細胞による骨形成を誘導する治療的有効量の誘導因子（BMP）をさらに含む、請求項1記載の組成物。

**【請求項4】** BMPがBMP-2である、請求項3記載の組成物。

**【請求項5】** BMP-2がOPC1によって治療的有効量として発現される組換えBMP-2である、請求項4記載の組成物。

**【請求項6】** 多孔質基質がポリ（D,L-ラクチド）およびコラーゲンを含有する、請求項1記載の組成物。

**【請求項7】** 請求項1記載の組成物を欠損部に導入することによる、骨欠損を治療するための方法。

**【請求項8】** 請求項2記載の組成物を欠損部に導入することによる、骨欠損を治療するための方法。

**【請求項9】** 請求項3記載の組成物を欠損部に導入することによる、骨欠損を治療するための方法。

**【請求項10】** 請求項4記載の組成物を欠損部に導入することによる、骨欠損を治療するための方法。

**【請求項11】** 請求項5記載の組成物を欠損部に導入することによる、骨欠損を治療するための方法。

(3)

特表2002-

法。

【請求項14】 骨誘導因子がBMP-2である、請求項13記載の方法。

【請求項15】 細胞が条件的不死化を受けた骨芽前駆細胞である、請求項記載の方法。

【請求項16】 OPC1を特定する特徴を有する、条件的不死化骨芽細胞。

【請求項17】 多孔質で骨導性で生分解性の保護成分によって保護さ  
衝成分を含む、骨欠損領域に骨形成性前駆細胞を投与するためのインプラ

【請求項18】 緩衝成分がヒドロゲルであって、多孔質で骨導性で生  
の保護成分がポリ( $\alpha$ -ヒドロキシ酸)基質である、請求項17記載のインプラ  
ント。

【請求項19】 保護成分中に骨形成性骨誘導因子を浸透させた、請求  
項記載のインプラント。

【請求項20】 骨形成性前駆細胞が、その骨形成性前駆細胞による骨  
分化および骨形成の促進のために十分な治療的有効量の骨誘導因子を発現  
ためのベクターによるトランスフェクションを受けている、請求項17記載  
インプラント。

【請求項21】 骨形成性前駆細胞の供給物、および  
骨形成性前駆細胞を骨内に送達するためのカニューレ  
を含む、骨を治療するための器具。

【請求項22】 請求項17記載のインプラントを送達するための大きさ  
形状を有するカテーテルを含む器具。

【請求項23】 内視鏡を含む、請求項21記載の器具。

【請求項24】 骨形成性前駆細胞を材料を骨内に送達するための器具。

(4)

特表2002-

記載の方法。

【請求項27】 骨欠損が、骨粗鬆症、嚢腫状空洞、外科的切除、外傷および先天性不全によって引き起こされた、請求項24記載の方法。

【請求項28】 中央の管腔および周辺の管腔を含むカニューレ。

【請求項29】 周辺の管腔が複数の小管腔 (lumena) を含む、請求項のカニューレ。

【請求項30】 カニューレ、ならびに

周辺部にらせん状ねじを有する回転可能な構成部分 (rotatable member) として、カニューレから伸びる回転可能な構成部分を含む、カートリッジユニット。

【請求項31】 回転可能な構成部分を回転させるための駆動体をさらに、請求項30記載のカートリッジユニット。

【請求項32】 骨芽細胞前駆細胞をらせん状ねじに供給するためにカニューレの一端に取り付けられた貯蔵槽をさらに含む、請求項30記載のカートリッジユニット。

【請求項33】 生きた対象の体内の領域に流動性物質を送達するためであって、

カニューレが体外の位置から体内の標的位置まで伸びるように、外部カニューレ (outer cannula) を体内に挿入すること、

複数の長軸方向通路が区別された内部カニューレ (inner cannula) をカニューレ内に設置すること、

通路の1つを通して体内に流動性治療物質を流し込み、同時に別の通路を通して材料を体外に流出させること

カニューレ

(6)

特表2002-

を誘導するとは思われず、このため、骨誘導性を欠くといわれている。

#### 【0004】

骨移植片および合成インプラントに伴うもう1つの問題は、骨外傷の大半を占める高齢者においてそれらの有効性がしばしば乏しいことである。身体を重ねるにつれて、移植片またはインプラントを治療過程にある骨欠損部に入れようとする際に必須である骨の再生能の一部は失われていく。この骨節能の障害に関連する臨床症状の一つが骨粗鬆症であり、これは衰弱性の骨粗鬆症をしばしば引き起こす。本疾患は骨形成（骨芽細胞による）と（破骨細胞による）との間の不均衡によって生じると考えられており、おそらくこの系の恒常性を維持する複雑な細胞間相互作用の障害によると思

#### 【0005】

ここ20～30年ほどの間、骨形成過程の分子的基盤は盛んな研究テーマとされている。骨誘導因子（bone morphogenetic protein (BMP)）として知られる調節性分子は、胚形成、維持期および修復時に骨を形成させる細胞過程付けに働くことが明らかになった。BMPはトランスフォーミング増殖因子、 $\alpha$ - $\beta$ ）スーパーファミリーに分類されている。このファミリーに属するBMP2～15が含まれる（BMP-1はTGF- $\beta$ スーパーファミリー）。BMP2～9の配列オズニー（Wozney）ら、Prog. Growth Factors 1: 267～280 (1989)、Mk rod. Dev. 32: 160～167 (1992) およびScience 242: 1528～1534 (1988) びにワング（Wang）ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9484～9488 (1988) により記載されている。

#### 【0006】

これらのBMPの遺伝子およびタンパク質は、分子量が16、18kDのポリペ

(7)

特表2002-

ワング (Wang) 、Proc. Natl. Acad. Sci USA 85 : 9484 (1988) : ウォズ Wozney) ら、Science 242 : 1528 (1988) 。この戦略を用いてBMP-1からBMP-9までが得られ、それらのアミノ酸配列が導き出された。BMP-2からBMP-9までアミノ酸配列の保存に基づき、BMP-2およびBMP-4、BMP-3 (オステオゲニンと呼ばれる) 、BMP-5からBMP-8まで (BMP-7およびBMP-8は、それぞれ骨形成性蛋白OP-1) および骨形成性蛋白質2 (OP-2) と呼ばれる) およびBMP-9という複素ファミリーに区分された。

#### 【0007】

さらに最近では、イナダ (Inada) ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 225 : 317~322 (1996) 、セレステ (Celeste) ら、J. Bone Miner. Res. 10 : 334~339 (1995) およびデュベ (Dube) ら、J. Bone Miner. Res. 10 : 335~340 (1995) により、BMP10~15がハイブリダイゼーションおよびポリメラーゼ連鎖反応を用いて同定された。BMP-12およびBMP-13はマウス増殖/分化因子 (それぞれGDF-7およびGDF-6) のヒト相同体であると思われる。

#### 【0008】

BMPに関して数多くの特許が発行されていることも、この分野の研究が盛んであることを示すもう一つの証拠である。米国特許第4,455,256号 (Urist) は、骨の脱灰、溶解剤中での骨組織の脱灰 (demineralizing) 、およびBMPの沈降、BMPの一般的な製造方法を開示している。精製されたBMP-1蛋白質の配列およびそれらをコードするDNA配列は米国特許第5,108,922号 (Wangら) に開示されている。米国特許第5,166,058号 (Wangら) および第5,318,898号 (Israel) はBMP-2の作製のための方法に関し、米国特許第5,618,924号 (Wangら) は産物を開示しており、一方、米国特許第5,670,338号 (Murakamiら) はBMP-3の遺伝子配列、BMP-3のcDNAのクローニング方法、BMP-3の発現方法、BMP-3の純化方法、BMP-3の測定方法、BMP-3の応用方法を開示している。

(8)

特表2002-

評価のためのスクリーニング法は、国際公開公報第96/38590号 (Harris) 考察されている。このように、さまざまなBMPをコードする配列が知られ、「骨誘導因子」という用語は種々のペプチドを包含する。

【0009】

BMPの特性、役割および解剖学的所在の概要を表1に示す。

【0010】

【表1】

BMP	特性、役割および解剖学的所在
BMP-1	プロテアーゼ (アスタシンファミリーの一員) ; プロコラーゲンI、IIおよびからのカルボキシルプロペプチドの除去にかかわるプロコラーゲンC-プロテアーゼとして働くと思われる ; BMPを活性化する ; 骨誘導性はない ; ランゲル・ディオン症候群 (Langer-Giedon syndrome) に関係すると思われる ; ショウウバエcolloid遺伝子の相同体 ; 背腹方向の胎児パターン形成。
BMP-2	骨誘導および胚形成 ; 胎児形成 ; 骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞の分化 ; 骨細胞活性および神経分化に影響を及ぼすと思われる ; 骨、脾臓、肝臓、脳臓、心臓、胎盤にあり、長骨、歯槽突起、脊椎固定術、中でも上顎洞拡大における修復を調節する。
BMP-3	骨誘導性 ; 軟骨形成性表現型の促進にかかわる ; 肺、腎臓、脳、腸にある。テオゲニンとしても知られる。
BMP-4	骨誘導性 ; 外胚葉性頂堤、髄膜、肺、腎臓、肝臓で認められる ; 胚形成時に腸形成および中胚葉形成にかかわる ; 背側大動脈により産生される ; 骨折修にかかわる ; 過剰発現は進行性骨化性線維異形成症の異所性骨化と関連。
BMP-5	骨誘導性 ; 肺、腎臓、肝臓で認められる ; 胚形成。
BMP-6	骨誘導性はない ; 胚形成、神経成熟および軟骨細胞分化にかかわる ; 肺、脾臓、子宮、筋肉、皮膚で認められる。
BMP-7	骨誘導性 ; 副腎、膀胱、脳、眼、心臓、腎臓、肺、胎盤、脾臓、骨格筋で認められる ; 胚形成ならびに長骨、歯槽骨および脊椎固定術の修復にかかわる ; 骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞の分化を誘導する。骨形成性蛋白質-1として知られる。
BMP-8	骨誘導性 ; 胎児形成 ; 骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞の分化 ; 骨形成性蛋白質-1として知られる。

(9)

特表2002-

## 【0011】

BMPの発見は、骨欠損部における骨再生を援助するために外因性BMPを用  
 とが可能になるという大きな期待から歓迎された。しかし、それらの骨形  
 の臨床的利用は当初に期待されたよりも困難であった。このように期待通  
 かった理由の一部は、BMPが骨形成効果を発揮するための適切な生物環境  
 する送達システムの発見が困難であったことである。適切な担体がなけれ  
 Pは適用しようとした解剖学的部位から急速に拡散し、間葉細胞に対して  
 い生物活性を発揮しえない程度に濃度が低下してしまう。キム (Kim) ら、  
 med. Material. Res. 35 : 279~285 (1997) は、造骨性細胞に組換えヒ  
 (rhBMP-2) によるエキスポ刺激を加えた後に、刺激された細胞を骨癒  
 (bony non-union) の領域内に移植することによってこの問題を克服し  
 唱した。しかし、この著者らは、この手法を用いて骨芽細胞の刺激が認め  
 ことを報告していない。リパモンティ (Ripamonti) ら、South African J  
 nce 91 : 277~280 (1995) は、力学的支持を与えるとともに間葉および血  
 速な侵入を促す、相補的で生体適合性がある彫刻造形が可能な基質を見  
 ないことが、BMPの効果的な担体を開発する上での障害になっていると指  
 ている。

## 【0012】

骨欠損部への移植が可能なポリマー基質中にある形で骨形成性蛋白質を  
 ようとの提案もなされている。アクリルエステル製のポリマー基質 (米国  
 4,526,909号、Urist) または乳酸重合体 (米国特許第4,563,489号、Urist  
 骨形成性蛋白質に対する担体として提案されている。クーバー・サンパス  
 r Sampath) らは、米国特許第4,968,590号において、グリコール酸および  
 ッザリマー およびポリエーザリマー から成るポリマーレゾネンスマテリアル



(10)

特表2002-

用は、ホリンガー (Hollinger) およびレオン (Leong) 、Biomaterials 17 : 187~194 (1996) に開示されている。リン酸カルシウムまたは酢酸カルシウムは米国特許第4,789,732号 (Urist) 、第5,306,303号 (Lynch) および第5,777,777号 (Yimら) に開示されている。基質を含むコラーゲンは、米国特許第4,847,777号 (Koezukaら) および第5,531,791号 (Wolfenbarger) に提案されている。

### 【0013】

BMPのための送達システムについては、マイヤーズ (Mayer) ら、Plastic Reconstruc. Surg. 98 : 247~259 (1996) に概説があり、そこではコラーゲン送達システムに関して、材料に免疫誘発性があるために理想的でないと思われる指摘がなされている。同様に、BMP-2および自家血液をポリ(ラクチド-ε-カプロラクトン)粒子に含むシステムは、軟組織の移動および被移植部の骨床から出血による血管性出血によって移動し、このために被移植部位における有効量のBMP-2が妨げられることが明らかになった。このため、何年も研究が行われたにもかかわらず、生体適合性があり免疫原性がなく、骨形成性因子の保持および局在化の十分な基質を提供すると同時に、血管の成長を許容し、欠損部における新骨の形成を妨げることなく内部に骨が成長しうる構造を提供するような送達システムに対する需要は今なおある。BMP-2を骨再生のために臨床的に用いるためにはこれらの問題のいくつかを克服するにはその大量投与が必要となるが、それは依然として臨床的に有用なものとはなっていない。

### 【0014】

骨芽細胞前駆細胞 (OPC) および骨形成におけるそれらの役割も、研究の大きな関心の的となっている。間質細胞の均質調製物からOPCを単離する方法は、リカード (Rickard) ら、J. Bone Min. Res. 11 : 312~324 (1996) に開示されている。OPCの増殖はエバンズ (Evans) ら、J. Ortho. Res. 13 : 555~565 (1995) に開示されている。

(11)

特表2002-

、ファング (Fang) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5753~5758 (1996) によって提唱されている。C3H10T1/2間葉細胞におけるBMP-2およびBMP-4は、アーレンス (Ahrens) ら、DNA and Cell Bio. 10: 871~880 (1993) されており、チャイニーズハムスター卵巣細胞におけるBMP-2の発現はイスラエル (Israel) ら、Growth Factors 7: 139~150 (1992) に開示されている

## 【0015】

骨修復の生物学的な理解の点では数多くの進歩が相次いでいるが、これを臨床的に有用な技術へと応用することは容易でない。

## 【0016】

このため、本発明の1つの目的は、修復中の骨欠損部に対して臨床的に有用な、骨欠損の修復のための有効な方法を提供することである。

## 【0017】

## 発明の概要

上記の目的は、欠損の修復のために骨欠損部内に移植される多孔質基質的に固定された、または隣接するOPCの治療的有效量を提供することによって成しうる。または、本発明は、例えば骨欠損部内に移植された条件的不死 (conditionally immortalized) OPCにおけるBMP-2の発現などの、骨誘導因子 (BMP) がOPC内で発現される方法を含む。BMPを産生するOPCは、OPCを移植部位に移植する多孔質基質に実質的に固定されても隣接してもよく、OPCはそれ自体でBMPを産生する。OPCを外因的な供給によってBMPの減少または機能的障害が生じている可能性のある罹患個体または高齢個体に移植すると、骨形成能が増強される。本発明は、BMPを発現するようにOPCにトランスフェクションを施すこと、および骨欠損を修復させる有効量のBMPを発現させるためのOPCの移植方法を含む。

(12)

特表2002-

なることなしに、血管伸長および骨形成を許容または促進するためにも適特定の態様において、本インプラントは、インプラントが骨の形成に伴うように、その局在部位での骨形成と比例した速度で分解する。骨形成的に促進または完了した時点でOPCに対して有毒な物質が放出されるような性インプラントを設計することも可能である。

### 【0019】

本インプラントは、保護および増殖のためにOPCが内部に懸濁化された懸濁液成分（例えば、ヒドロゲルなどのゲル懸濁液）を含みうる。インプラントは、例えば、ポリ乳酸（PL）やポリグリコリド（PG）のホモポリマー、およびこれらのコポリマーである（ラクチド- $\alpha$ -グリコリド）（PLG）といったポリ（ $\alpha$ -ロキシ酸）（PHA）などの、分解性で実質的に生体適合性であって免疫原性材料などの多孔質支持成分を含んでもよい。この支持成分は、軟組織を支えるゲル成分を保護するとともに、内部に骨成長が起こりうる生物学的鑄型（biological template）を提供する、比較的強固な環境をもたらす。この支持成分は、例えばゲルのコアを取り巻く隣接性皮層として、または層状もしくは多層状インプラントにおける隣接層として、懸濁液成分に対して保護的な関係にあるように置かれる。支持成分が、懸濁液成分中のOPCを活性化するための治療的有効成分（BMP）を含んでもよい。BMPを浸透させた支持成分中に懸濁化させた場合、特定の態様におけるOPCは、生理的または超生理的用量のBMPを発現するように形質を受け取る。しかし、本発明には、BMPを発現するような操作は受けていないような多孔質支持成分の基質中に浸透したBMPに対して曝露されうる天然型のOPCにはBMPを発現するような操作を受けておらず、BMPを浸透させた基質中に含まれないOPCも含まれる。

### 【0020】

(13)

特表2002-

じる構造的基質の双方をもたらしインプラントと併用して投与することも。骨粗鬆症の治療のために用いる場合には、新骨形成を促すために、細胞またはインプラントのいずれかを骨粗鬆症性もしくは骨減少性の骨の被移植床(recipient bed)に導入する。被移植床は、例えば、骨粗鬆症性骨の中にカテーテルを導入し、骨内部に過剰な背圧を生じずに内部に細胞またはインプラントを導入しうる局所的空隙または空洞を骨内部に作ることによって調製することができる。

#### 【0021】

また、本発明には、OPCなどの骨形成性細胞系(osteogenic lineage)への分化が運命づけられた治療的有効量の細胞も含まれる。骨形成性細胞系への分化をもつ細胞には、細胞系OPC1の特徴を有する条件的不死化骨芽細胞前駆細胞が含まれる。特定の態様において、多孔質基質はポリ(D,L-ラクチド)およびゲルの配合物からなる。その他の態様において、組成物は治療的有効量のより詳細にはBMP-2も含みうる。さらなる態様には、OPC1によって発現され、交換BMP-2が含まれる。

#### 【0022】

細胞懸濁液またはインプラントを体内に導入するための送達装置は、懸濁液またはインプラントを望ましい位置へと進めるためのカテーテルを含む。例として、インプラントを円柱状にすることにより、管状カテーテルと組み合わせた場合、カテーテル壁と適合するようにインプラントを設計してもよい。円柱状インプラントは、例えば、ゲル状のOPC懸濁液コアの周囲に円柱状支持皮層を用意する、または管状カテーテル内への導入のために層状インプラントを折り曲げ可能な形状にすることによって形作ることができる。他の形態のインプラントを用いて、骨粗鬆症性骨の被移植床に適合する形状にインプラントを形作ることができる。

(14)

特表2002-

て「骨形成術」を施行するために、先端を骨内に導入した後に拡張可能なば、バルーンカテーテルの先端の拡張による) 空洞形成性先端を備えた遠有することが可能である。空洞が形成された後にバルーンを脱気し、加圧大した空洞内にカテーテルを通じてインプラントを挿入する。空洞の寸法インプラントが空洞を実質的に充填するように、インプラントと実質的に同たはやや大きい) であってよい。または、細胞を懸濁液中に分散させずに空洞内を緩やかに導入することも可能である。緩やかな導入は、内視鏡びたオーガー (auger) を用いて行いうる。骨減少性骨領域へのOPCの導入骨形成による空洞内の充填に役立つだけでなく、BMPを発現するOPCは患者天然のOPCを骨減少性骨の部位に動員し、周囲の骨における付加的な骨形成促す。

#### 【0024】

また、本発明には、BMP反応性であって外因性または前記生理的濃度のE現する新規細胞系 (OPC1など)、このような細胞系を作製し、それらを系不死化させる組換え法、OPCを組み入れた組成物、およびインプラントの系が含まれる。開示される特別なOPCは、アスコルビン酸およびグリセロリン培地に添加しなくても骨形成を開始することができ、しかも接触阻止を示のため集密化した後に細胞増殖がみられない。これは腫瘍化のおそれがないを意味する)。

#### 【0025】

本発明の上記およびその他の目的、特徴および利点は、添付の図面を参から進められる以下の好ましい態様の詳細な説明により、さらに明らかに考えられる。

#### 【0026】

(15)

特表2002-

配列番号1：オステオカルシンの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号2：オステオカルシンの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号3：オステオネクチンの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号4：オステオネクチンの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号5：オステオポンチンの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号6：オステオポンチンの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号7：PTH受容体の発現に関してOPC細胞の表現型分析を行うた  
めのPCRプライマー。

配列番号8：PTH受容体の発現に関してOPC細胞の表現型分析を行うた  
めのPCRプライマー。

配列番号9：アルカリホスファターゼの発現に関してOPC細胞の表現型分  
析を行うためのPCRプライマー。

配列番号10：アルカリホスファターゼの発現に関してOPC細胞の表現型分  
析を行うためのPCRプライマー。

配列番号11：プロコラーゲンIの発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

配列番号12：プロコラーゲンI 発現に関してOPC細胞の表現型分析を  
行うためのPCRプライマー。

(15)

特表2002-

詳細な説明

【表2】 略号および定義

BMP	骨誘導因子
CCD	皮層コア装置
CSD	重大な大きさの欠損 (自然治癒しない程度に十分に大きい骨欠損) 長骨におけるCSDは骨幹直径の2~3倍とみなされる
IPL	一体型ポリマー多層物
OPC	骨芽細胞前駆細胞
骨導	宿主辺縁からの血管組織の伸長、 これに続いて新骨形成(骨誘導)が起こる
PHA	ポリ( $\alpha$ -ヒドロキシ酸)
PG	ポリグリコリド
PL	ポリ乳酸
PLG	ポリ(ラクチド-co-グリコリド)

## 【0028】

単離された：「単離された」生物成分（核酸分子、蛋白質またはオルガなど）は、その成分が天然にみられる細胞のオルガネラにおいて他の生物成分と、他の染色体および染色体外のDNAおよびRNA、蛋白質ならびにオルガから実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸および蛋白質、標準的な精製法によって精製された核酸および蛋白質が含まれる。このは、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸および蛋白質、は化学合成された核酸も含まれる。

## 【0029】

オリゴヌクレオチド：長さが6~300ヌクレオチドの範囲にある線状のポ

リヌクレオチド

(17)

特表2002-

たDNA配列は互いに近接しており、2つの蛋白質コード領域が連結する必要がある場合には、同じリーディングフレーム中にある。

### 【0031】

ORF (オープンリーディングフレーム) : 内部に終止コドンを含まない、ノ酸をコードする一連のヌクレオチドトリプレット (コドン)。これらの通常、ペプチドへと翻訳される。

### 【0032】

薬学的に許容される担体 : 本発明において有用な薬学的に許容される担体通常のものである。 マーチン (E. W. Martin) によるレミントン薬学 (Remington's pharmaceutical Sciences)、Mack Publishing Co., Easton, PA、第1版 (1975) は、本明細書に開示される融合蛋白質の薬学的送達のために適した担体および製剤を記載している。

### 【0033】

一般に、担体の性質は、用いる個々の投与の態様に依存すると考えられ、例えば、非経口的製剤は通常、水、生理的食塩水、平衡塩類溶液、水性デキース、グリセロールなどの薬学的および生理学的に許容される液体を含む可能な液体を媒体として含む。固体組成物 (例えば、粉剤、丸剤、錠剤またはセル剤) の場合は、例えば、薬学的等級のマニトール、ラクトース、デキースまたはステアリン酸マグネシウムなどの、従来の非毒性担体を含めることとなる。投与しようとする薬学的組成物は、生物学的に中性な担体に加えて、および乳化剤、保存薬およびpH緩衝薬などの非毒性佐剤を微量に含む。

### 【0034】

精製された : 精製されたという用語は、絶対的に純粋であることを求め、例えば、相対的な用語として用いられる。例えば、精製された



(18)

特表2002-

は別々に分離された2つの配列断片の人工的組み合わせによって作られたもの、または有するものをいう。この人工的組み合わせは、化学合成によって、または一般的には、例えば遺伝子工学技術による単離された核酸断片の人工的操作で達成しうる。

### 【0036】

同様に、組換え蛋白質とは、組換え核酸分子によってコードされるものである。

### 【0037】

配列の同一性：2つの核酸配列または2つのアミノ酸配列の間の類似性は、の同一性として言及しない限り、配列間の類似性として表現される。配列性はしばしば一致率（または類似度もしくは相同性）として測定され、そのが高いほど2つの配列は類似している。二重特異性融合蛋白質の相同体は、的な方法を用いて整列化した場合に比較的高度の配列同一性を有すると考える。

### 【0038】

比較のために配列を整列化する方法は、当技術分野で周知である。さまざまなプログラムおよび整列化アルゴリズムが以下のものに記載されている：スミス (Smith) およびウォーターマン (Waterman) (Adv. Appl. Math. 2:482、1970)、ニードルマン (Needleman) およびブンス (Wunsch) (J. Mol. Biol. 43, 1970)、ピアソン (Pearson) およびリップマン (Lipman) (PNAS. 75:2444, 1978)、ヒギンズ (Higgins) およびシャープ (Sharp) (Gene, 73:237-244, 1988)、ヒギンズおよびシャープ (CABIOS 5:151-153, 1989)、ペ (Corpet) ら (Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988)、ファン (Huet) および (Comm. Annls. Biochim. 8:155-65, 1992)、また (J. Biomol. Struct. Methor

(19)

特表2002-

たはLFASTA (PearsonおよびLipman, 1988) を、配列の比較を行うために最もよい (Internet Program (c) 1996, W. R. Pearson, およびバージニア University of Virginia) 「fasta20u63」バージョン2.0u63、リリース日12月)。ALIGNは配列全体を別のものと比較し、LFASTAは局所的な類似性の領域を比較する。これらの整列化ツールおよびそれぞれの指導マニュアルインターネット上で<http://biology.ncsa.uiuc.edu>から入手可能である。

## 【0040】

開示される二重特異性融合蛋白質のオルソログ (ortholog) は、典型的初期設定パラメータに設定したALIGNを用いて完全長整列化に関して算出。二重特異性融合蛋白質のアミノ酸配列との配列一致率が75%を上回るというもの。参照配列との類似度がさらに高い蛋白質をこの方法によって評価合には、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の配列一致率といったさまざまなを示すと考えられる。さらに、開示された融合蛋白質の一方または両方のメインの完全長にわたって配列の同一性を比較することもできる。この場合の一致率は、完全長配列の同一性に関して考察される値と本質的には同ると考えられる。

## 【0041】

配列全体よりも著しく短い配列を同一性に関して比較しようとする場合ホモログ (homolog) は典型的には、10~20アミノ酸という短いウィンドウにわたって少なくとも80%の配列一致率を有すると考えられ、参照配列とのに応じて、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の一致率を有することもある。このような短いウィンドウ幅にわたる一致率はLFASTAを用いて算出可能であり、その方法は<http://biology.r>

(20)

特表2002-

## 【0042】

2つの核酸分子が密接な関係にあることを示す代替的な指標は、2つの分子がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる環境パラメータの下では異なる。ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHでの特異的配列を有する核酸分子の熱融点 ( $T_m$ ) よりも約5℃～20℃低くなるように選択される。 $T_m$  は、2つの核酸分子の50%が、完全にマッチングがなされたプローブとハイブリダイズする規定のイオン強度およびpHで) である。核酸ハイブリダイゼーションの条件およびストリンジェンシーに関する計算は、サムブルック (Sambrook) ら (分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989) およびティッセン (Tijssen) (生化学および分子生物学における実験テクニック (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) 第1部、第2章、Elsevier、New York, 1993) から得ることができる。開示された二重特異性融合蛋白質配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子は、典型的には、融合蛋白質全体のコード配列、結合ドメイン全体、またはコード配列のその他の選択された部分のいずれかに基づくプローブと、0.2×SSC、0.1% SDS、65℃の洗浄条件下でハイブリダイズすると考えられる。

## 【0043】

高度の一致率を示さない核酸配列であっても、遺伝暗号の縮重性のため類似したアミノ酸配列をコードすることがある。この縮重性を利用して、実質的に同じ蛋白質を互いにコードする多数の核酸配列を作製するために、核酸配列の縮重化を作りだせることが理解されている。

## 【0044】

(21)

特表2002-

入しうるすべての技法を含む。

#### 【0045】

ベクター：核酸分子が宿主細胞内に導入されることにより、形質転換宿が生じる。ベクターには、複製起点などの、宿主細胞内におけるそれ自体を許容する核酸配列を含めてもよい。また、ベクターは、当技術分野で知られたまたは複数の選択可能マーカーおよび他の遺伝的要素も含みうる。

#### 【0046】

本発明は、治療するにしても非常に緩徐と考えられる骨欠損部（重大な欠損部など）の治療促進を目的とする、骨内移植用の多孔質基質中に局在する、ヒト胎児造骨性細胞（hFOB）細胞などの骨芽細胞前駆細胞（OPC）、不死化造骨性細胞を提供する。OPCに対して、BMP-2、3、4、5、7または変換した組換えヒトBMP（rhBMP）などの組換え骨誘導因子（rBMP）によるトランスフェクションを施してもよい。本明細書で用いる「不死（immortal）」または不死化（immortalized）細胞とは、実質的に無限な細胞生存能を備え、実在的および永続的に樹立された細胞培養物を意味する。これは実質的に培養しうる細胞である。また、本発明には、条件的不死化培地の存在下で分裂性であって分裂するが、条件的不死化成分が培地から除去されると細胞を停止し、しかしながらOPCに特徴的な蛋白質は発現し続ける細胞である、条件的不死化細胞も含まれる。これらの細胞は、正常ヒト造骨性細胞に特徴的な蛋白質の補完物を産生し、骨芽細胞に分化しうる。

#### 【0047】

本発明のいくつかの態様においては、条件的不死化ヒト胎児骨芽細胞がシウウイルス40（SV40）ラージT（Tag）またはスモールt（tag）抗原を発現し、細胞は永続的に増殖可能なように、永続的に増殖する細胞は維持される。

(22)

特表2002-

治療される骨欠損部など)で内因性に産生されるほか、治療が起こるにつ  
ンターフェロンの濃度が徐々に低下するためである。このため、条件的不  
胞は、創傷内に最初に移植された後には急速に分裂するが、創傷が治療す  
胞分裂を停止して骨形成性骨芽細胞への分化を続けるように設計される。

#### 【0048】

これらの細胞は樹立された「細胞系」の一部ではあるが、それらは一般  
瘍形成性であり、すなわちそれらは哺乳動物の体内で腫瘍を形成しない。  
は、例えば、細胞を不死化または条件的に不死化させ、BMPの発現をコー  
遺伝子によるトランスフェクションがなされた細胞系のクローン集団の一  
の、均一な集団の一部でもよい。「クローン性 (clonal)」という用語は  
の前駆細胞に由来する均一な細胞集団に対する言及である。「トランスフ  
ョン」という用語は、外来性DNAが真核細胞に導入され、発現される過程  
。外来性DNAは、環状または線状プラスミドベクターなどの発現ベクター  
まれることが典型的である。開示される本発明の1つの態様の調製におい  
ヒト骨芽前駆細胞が、発現ベクターpMX-1-SV40Tによるトランスフェクシ  
よって条件的不死化を受ける。さらに、細胞に対して、抗生物質、抗腫瘍  
は除草剤などの非形質転換細胞に対して通常は有毒である薬剤に対する耐  
ードする遺伝子などの、選択可能マーカーによるトランスフェクションを  
とも可能である。開示される1つの態様において、細胞は、ネオマイシン  
は類似薬剤に対する耐性などの選択因子をコードする発現ベクター (pMX-  
T-Neo-195) または形質転換細胞を選択的に死滅させうる「自殺遺伝子」  
する発現ベクターによるトランスフェクションを受ける。

#### 【0049】

開示される本発明の調製は、OPCを樹立する細胞系を用いており、それら

(23)

特表2002-

において、BMP発現バクターは、例えば、KS-hBMP-2、IgSP-NS-hBMP-2、Ig-hBMP-2およびIgSP-RRRR-hBMP-2発現バクターを特定する特徴を有するプラなどの、プラスミドである。

### 【0050】

この骨芽細胞前駆細胞（OPC）系は、BMP-2に対して反応性であり（すなわちBMP-2への曝露によって細胞分化活動が刺激される）、骨修復反応を増強する。rhBMP-2遺伝子を含むプラスミドバクターによってOPCを遺伝的に改変したOPCを骨欠損部に局所的に導入することにより、OPCがBMPを連続的に発現することが可能になり、欠損を修復する細胞過程の刺激および協調を助ける。従って、本発明の方法を用いて、さまざまな骨欠損（外傷性骨損失または先天性など）を治療することができる。また、本方法を、骨量減少、先天奇形の特には、骨粗鬆症による被害が最も多く生じる解剖学的部位である骨減少性骨質減少に用いることも可能である。本方法では、椎骨骨量減少、骨形成の低骨芽細胞と破骨細胞との間の不均衡、前駆細胞の減少、および／または骨細胞の反応性に対抗するために、BMP反応性細胞のプール（高齢者では枯渇していることが多い）を増幅し、局所的に発現されるBMP分子を増加させる。BMPを構成発現するOPCは、骨再生にとって極めて重要なこれらの要素の局所的濃度を高める。

### 【0051】

#### BMPの選択

BMP2～15はトランスフォーミング増殖因子 $\beta$ スーパーファミリーに分類され、胚における細胞およびそれらの組織的構成の組織および器官への進展を指導する。身体パターン形成、肢発生、骨の大きさおよび数に影響を及ぼし、胎児および成人の骨形成の維持を調節する（主として、骨形成のために特に骨形成BMPの1つ

(24)

特表2002-

d Rel. 36 : 183~195 (1995) 、ヤスコ (Yasko) ら、J. Bone Joint Surg : 659~671 (1992) 、ステイーヴンソン (Stevenson) ら、J. Bone Joint 76-A : 1676~1687 (1994) 、クック (Cook) ら、J. Bone Joint Surg. 77 : 827~838 (1994) ; Hollingerら、J. Controlled Rel. 39 : 287~304 (1996) ; ルハルト (Gerhart) ら、Clin. Orthop. Rel. Res. 293 : 317~326 (1993) ; らに、rhBMPはイスおよびマカク属非ヒト霊長類における脊椎固定術に対して用され、rhBMPは通常は新骨形成による治療が起こらない重大な大きさの欠損の再生を促した ; ボーデン (Boden) ら、Endocrinol 137 : 3401~3407 (1995) 。BMP-2がこれらの臨床的用途に対してすでに用いられることに鑑み、BMPの発明の開示される態様とともに説明する。しかし、骨形成を増強させる方法にも、例えばBMP-3、BMP-4、BMP-5、BMP-7およびBMP-9、特にBMP4および9の任意の骨誘導性BMPを用いることができる。表1に骨形成性と記載されている他のBMPも、それらが直接的な骨形成性をもつBMPの活性を調節または刺激範囲内で用いることができる。

### 【0052】

#### 骨芽細胞前駆細胞 (OPC) の選択

培養系における造骨性細胞の分化には、プログラムされた一連の発生過程が関与する。この一連の過程は、細胞が比較的未分化な骨芽前駆細胞または骨芽細胞 (OPC) である初期の増殖期、ならびに骨細胞表現型マーカーの発現および最終的に細胞外基質の石灰化がかかわる後期を特徴とする。例えば、参照とみ入れられる、アロノウ (Aronow) ら、J. Cell Physiol. 143 : 213 (1980) ; およびスタイン (Stein) ら、FASEB J. 4 : 3111 (1990) を参照されたい。(オステオカルシン (OSC) 、オステオネクチン (OSN) 、オステオポンチン (OPN) 、PTHrP、PTH、マリンカリシマ酵素 (AP) およびTGF- $\beta$ )

(25)

特表2002-

回復のために十分な量のOPCを骨粗鬆症に供給するという点で、他のアプリとは異なる。多孔質基質中に局在化または固定されたOPCの存在により、OPCが驚くべき程度で増強されることが明らかになった。その他の態様において、骨沈着を促進させるために十分な量の外因性BMPを基質中に供給する。1つの態様においては、BMPはOPCから発現され、OPCからのBMPをインサイチュウ用しうるため、供給する必要のあるrhBMPの外因性用量を極力減らすことができる。OPCからのインビボ産生がなければ、局所反応性細胞集団の骨芽細胞への増強によって骨形成効果を得るためには、ミリグラム単位の量のBMP（約1.7~2.0mgを上回る用量）が必要である。OPCによるBMPがインサイチュウ産生されると、BMPが細胞により局在化され、同じく骨沈着過程に深くかかわる細胞媒体（cellular vehicle）中に送達されるため、送達する必要のある量ははるかに少なくて済む。以上のように、OPCは、BMPをデノボ合成し、持続的なBMPの産生を可能とすることにより、細胞性「バイオリアクター」の機能を果たすと考えられる。OPCからBMPが投与されることは、前駆数が乏しく、機能的な障害の可能性もある高齢患者には特に有用である。

#### 【0054】

OPCとしては任意の種に由来するものを用いるが、用いるには、骨欠損を治療しようとする動物と同じ種からのOPCを選択することが好ましい。この例ではヒト、イヌ、サル、ラットおよび他の種に由来するOPCを本発明に従って用いる。OPCを従来の技法によって入手し、続いて不死化させて（または条件的不死化させて）骨内の基質中に局在化させてもよい。また、OPCに対して、発現する遺伝子によるトランスフェクションを施してもよい。以下の実施例がこの工程における詳細な段階を例示する。

#### 【0055】



(26)

特表2002-

ことには、治療過程にある骨欠損部にかなりの量の脂肪または線維形成を  
す可能性のある細胞に比べて特に有利であるが、これはそのようなかなり  
非骨組織は骨癒合および最終的には欠損の治療の妨げとなるためである。

### 【0056】

本発明において有用な細胞の具体例の一つは、1998年2月12日に寄託され  
C CRL-12471を特定する特徴を有する条件的不死化細胞系OPC1であり、この  
形成性細胞系への分化を運命づけられたOPCであって、BMP-2を発現するよ  
伝子によるトランスフェクションを施すことが可能である。細胞の骨形成  
系への運命づけは、細胞をBMP-2、BMP-4またはBMP-9などのBMPで刺激し、  
2に記載するスクリーニング法によって骨芽細胞表現型の発現を観察するこ  
より判定可能である。寄託された細胞系からの細胞は、例えば濃度10ng/  
BMP-2、さらにおそらくは5ng/ml、またはさらに2ng/mlのrhBMP-2といっ  
の低用量のBMPに反応して分化する能力を含め、多くの好ましい特徴を示  
た、寄託された細胞系は、少なくともP50まで、例えば約P80もの継代が可  
ることが示されている。

### 【0057】

BMPをOPCと接触させること、またはOPCからBMPを発現させることに加え  
Pをさらに成熟した骨芽細胞（実施例2に記載した表現型を備えたもの）と  
せること、またはそれから発現させることも可能である。OPCと同じく、こ  
胞も骨形成性細胞系への分化を運命づけられた細胞の一例であり、この方  
かに分化が進んでいる。成熟型の骨芽細胞は通常は分裂しないため、骨欠  
移植しうる分裂細胞のクローン系を作製することはできない。しかし、OP  
遺伝子を導入し、それを成熟させた後に骨欠損部に移植してそこに局在化  
る細胞は、BMPを発現させることが可能である。この細胞は、OPC

(27)

特表2002-

ンパ球など)が含まれる。

【0059】

# 実施例1

## 不死化ヒト骨芽前駆細胞系OPC-1の樹立

シミアンウイルス40 (SV40) 癌遺伝子は、スモールt抗原 (tag) およびT抗原 (Tag) とともに、さまざまな種類の細胞の形質転換を引き起こす核内白質である。本発明では、条件的不死化細胞系を作製するためのトランスクション手順においてpMX1-SV40Tag-Neo-195プラスミドDNA (図3) を用いた「条件的不死化」細胞系とは、制御可能な一組の環境 (インターフェロン駆動モーターに対するインターフェロンの存在、など) 内では細胞分裂を継続、細胞分裂が停止または著しく抑制されるように選択的に誘導しうるもの (例えば、プロモーターを駆動する有効量のインターフェロンを細胞環境から除去する、などによる)。

【0060】

本実施例においては、MX-1プロモーターがSV40ラージTagの発現を指令するMX-1DNAを発現するトランスフェクト細胞は、ヒトA/Dインターフェロン (West Caldwell, NJから販売されている組換えヒトインターフェロンHu-IFN- $\alpha$ 2b) およびHu-IFN- $\alpha$ 2bから作製されたハイブリッド型 $\alpha$ インターフェロンの1:1存在下でSV40Tagを駆動させることにより、増殖の増強を示す。インターフェロンを除去すると、この細胞の有糸分裂活性は低下する。SV40Tagを構成的に発現する遺伝子によるトランスフェクションを受けた骨細胞系の樹立を検討し、研究機関もいくつかあるが (Keetingら、J. Bone Miner. Res. 7: 127~132 (1992)、Evansら、J. Orthoped. Res. 13: 317~324 (1995))、一方、許諾を得た下で、ヒト骨芽細胞系を条件的に不死化させるSV40Tagの過剰発現は、

(28)

特表2002-

Co.) (St. Louis, MO) またはギブコBRL社 (Gibco BRL Inc.) (Grand  
、NY) から購入した。ファルコン (Falcon) 組織培養用プラスチック器具  
トンディッキンソン社 (Becton Dickson and Co.) (Franklin Lakes, NJ)  
入手した。クイックプレブマイクロmRNA精製キット (QuickPrep Micro mR  
キット) はファルマシアバイオテック社 (Pharmacia Biotech, Inc.) (Pis  
y, NJ) から購入し、アクセスRTPCRシステム (Access RTPCR System) は  
ガ社 (Promega Inc.) (Madison, WI) から購入した。PCR用プラスチック  
パーキンエルマー社 (Perkin Elmer, Inc.) (Norwalk, CT) から購入し、  
ieve 3:1アガロースはRMCバイオプロダクツ (RMC BioProducts) 社 (Roc  
、ME) から入手した。組換えヒト骨誘導因子-2 (rhBMP-2) はジェネティ  
ンステイテュート社 (遺伝子tics Institute, Inc.) (Andover, MA) か  
され、BMP-2の産生および精製の方法はワング (Wang) ら、Proc. Natl. A  
ci. USA 87: 2220~2224 (1990) およびウォズニー (Wozney)、Progress  
owth Factors 1: 267~280 (1989) に記載されている。

### 【0062】

施設内で承認されたプロトコールに準拠して、在胎期間ほぼ12~13週の  
織を入手した。10mM HEPES、pH 7.4を添加したHBSS中に細胞を維持し、  
および単離のために研究施設に搬送した。骨芽細胞は、ギャラガー (Callag  
ら、ヒト細胞培養プロトコール (Human Cell Culture Protocol)、Humar  
s、p233~262 (1996) (これは参照として組み入れられる) の通りに、O  
ラゲナーゼP (Boeringer-Mannheim、Indianapolis, IN) および0.25%トリ  
ンを用いる反復消化法を用いて、ヒト胎児骨膜および大腿骨から入手した  
または4回の反復消化を用いることが可能であるが、4回目の細胞調製物の  
細胞は骨芽細胞とみなされ、その後の培養には前記細胞が用い

(29)

特表2002-

初回分離株P0であり、いったん集密状態に達した時点で、0.25%トリプシンAによる酵素的剥離の後に継代培養を行って第1継代株 (P1) とした。

### 【0063】

初期継代骨細胞をP3まで維持および継代し、その時点で標準的なリン酸ウム法によってそれらにトランスフェクションを行い (Strata遺伝子 (登録、La Jolla, CA)、CsClで精製したpMX1-sv40T抗原-Neo-195プラスミドDNAを宿主細胞ゲノム中に組み入れた。プラスミドpMX1-sv40T-Neo-195は、ミニングベクターpSP65中で2.3kbのマウスMX-1プロモーターを2.1kbのSV40断片を融合させることによって作製した。1.9kbのマウス $\beta$ グロビン3'非翻訳域 (3' UTR) をプラスミドのBamHIおよびXbaI部位に導入し、その結果得られたプラスミドをpMX1-sv40Tと命名した。SV40プロモーターによって駆動されるマイシンホスホトランスフェラーゼを含む1,518bpのHindIII-XmnI断片をpMX1 (Invitrogen, San Diego, CA) から単離して、EcoRIにより消化したpMX1中にサブクローニングし、クレノウ配列でギャップ充填を行ってpMX1-sv40T-Neo-195プラスミドDNAを作製した (図3)。P3骨細胞には、抗生物質を含まないマイトジェン血清規定培地であるUltraCULTURE (登録商標) (BioWhittaker, Walkersville, MD) 中で一晩トランスフェクションを行った。

### 【0064】

トランスフェクション手順の後、プレートを培地ですすぎ、新たな $\alpha$  MEM FBS中で一晩培養した。その翌日に0.5mg/ml G418-硫酸 (ネオマイシン類) を添加した $\alpha$  MEM/5% FBS培地中でトランスフェクト細胞を選択した。G418耐性、ネオマイシン毒性に対する耐性を付与する遺伝子が組み入れられた安定的トランスフェクタントの選択が可能となる。10~14日間の選択期間をおいた後、0.1/100の割合でA/Dノンセレクトロニック2mg/mlのG418を含む $\alpha$  MEM/5%

(30)

特表2002-

初回プレーティングの時点での骨芽細胞前駆細胞調製物 (P0) では付着が得られ、細胞は一般に多角形であって間欠的に紡錘形を呈し、細胞の周すかな複屈折を伴う形態が認められた。P0のプレーティングから5~8日間、細胞はその他の骨形成性細胞系と一致する形態を示す集密的細胞単層をた。増殖速度および継代限界を決定するために、トランスフェクト細胞とて対照非トランスフェクト細胞の維持および継代を行った。一般に、正常芽細胞様細胞の増殖速度はトランスフェクト細胞系よりも低かった (表3) た、非形質転換細胞では、20回目の継代 (P20) 後に増殖速度が有意に低下し、P25とP28との間で老化細胞となって増殖を停止した。

【0066】

【表3】

OPCクローン	倍加時間 (日)	APase (対照)	APase (10 ng/ml BMP-2)	石灰化	継代数
1	1.8	15.6±1.5	122.4±17.6	+++	10
2	1.9	13.6±2.3	48.6±5.4	++	10
3	1.67	14.5±2.1	55.8±6.6	++	10
4	3.3	*ND	*ND	-	8
5	2.4	*ND	*ND	-	8
6	2.2	14.4±2.4	68.4±5.8	++	10
7	2.9	*ND	*ND	-	8
非形質転換細胞	2.4	12.8±1.8	28.8±2.2	+	10

\*ND = 未決定